

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Hyun-Ah KANG et al.

Appl. No: : Not Yet Assigned

PCT Branch

Filed : Concurrently Herewith

PCT/KR2003/001279

For : HANSENULA POLYMORPHA YAPSIN DEFICIENT MUTANT STRAIN
AND PROCESS FOR THE PREPARATION OF RECOMBINANT
PROTEINS USING THE SAME

CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 and 365 based upon Republic of Korea Application No. 10-2002-0037718, filed 29 June 2002.

The International Bureau already should have sent a certified copy of the Republic of Korea application to the United States designated office. If the certified copy has not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,
Hyun-Ah KANG et al.Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027Leslie J. Paperner
Reg. No. 33,329December 28, 2004
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1950 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

BEST AVAILABLE COPY

10/518377

23 DEC 2004

PCT/KR 03/01279

RO/KR 06.08.2003

REC'D 20 AUG 2003

WIPO PCT

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0037718
Application Number

출원년월일 : 2002년 06월 29일
Date of Application

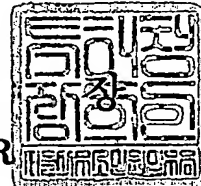
출원인 : 한국생명공학연구원
Applicant(s) Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnol

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003 년 07 월 15 일

특 허 청

COMMISSIONER



1020020037718

출력 일자: 2003/7/16

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.06.29
【발명의 명칭】	한세놀라 폴리모르파 앱신 유전자 결손 변이주 및 이를 이용한 재조합 단백질 생산 방법
【발명의 영문명칭】	Hansenula polymorpha yapsin deficient mutant strain and process for the preparation of recombinant proteins using the same
【출원인】	
【명칭】	한국생명공학연구원
【출원인코드】	3-1999-034166-5
【대리인】	
【성명】	손민
【대리인코드】	9-1999-000420-6
【포괄위임등록번호】	2002-050197-2
【대리인】	
【성명】	이세진
【대리인코드】	9-2000-000320-8
【포괄위임등록번호】	2002-050198-0
【대리인】	
【성명】	김성남
【대리인코드】	9-1998-000150-9
【포괄위임등록번호】	2002-050199-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	강현아
【성명의 영문표기】	KANG, Hyun Ah
【주민등록번호】	630119-2067015
【우편번호】	305-345
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 하나아파트 102동 1202호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이상기
【성명의 영문표기】 RHEE, Sang Ki
【주민등록번호】 510605-1010411
【우편번호】 305-345
【주소】 대전광역시 유성구 신성동 하나아파트 102동 1202호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 손민정
【성명의 영문표기】 SOHN, Min Jeong
【주민등록번호】 790814-2448821
【우편번호】 306-200
【주소】 대전광역시 대덕구 덕암동 175-15
【국적】 KR

【미생물기탁】

【기탁기관명】 KCTC
【수탁번호】 KCTC 10281BP
【수탁일자】 2002.06.18

【미생물기탁】

【기탁기관명】 KCTC
【수탁번호】 KCTC 10282BP
【수탁일자】 2002.06.18

【미생물기탁】

【기탁기관명】 KCTC
【수탁번호】 KCTC 10283BP
【수탁일자】 2002.06.18

【미생물기탁】

【기탁기관명】 KCTC
【수탁번호】 KCTC 10285BP
【수탁일자】 2002.06.18

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 12
【서열목록의 전자파일】 첨부

1020020037718

출력 일자: 2003/7/16

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대
리인
민 (인) 대리인
이세진 (인) 대리인
김성남 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 21 면 21,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 0 항 0 원

【합계】 50,000 원

【감면사유】 정부출연연구기관

【감면후 수수료】 25,000 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 한세놀라 폴리모르파 앱신1을 코딩하는 *HpYPS1* 유전자를 포함한 핵산 분자, 이에 암호화된 폴리펩타이드, 한세놀라 폴리모르파 앱신1을 코딩하는 *HpYPS* 유전자의 돌연변이로 인해 앱신 활성이 감소된 한세놀라 폴리모르파 변이주, 이 한세놀라 폴리모르파 변이주에 외래단백질을 코딩하는 유전자를 도입하여 제작된 외래 단백질을 발현하는 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주, 이 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주를 외래 단백질이 발현되도록 하는 조건하에서 배양하고 배양물로부터 외래 단백질을 분리함을 포함하여 외래 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다.

【대표도】

도 5

【색인어】

한세놀라 폴리모르파 앱신 유전자 결손 변이주

【명세서】

【발명의 명칭】

한세놀라 폴리모르파 앱신 유전자 결손 변이주 및 이를 이용한 재조합 단백질 생산 방법 {Hansenula polymorpha yapsin deficient mutant strain and process for the preparation of recombinant proteins using the same}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 한세놀라 폴리모르파 앱신1을 코딩하는 유전자 *HpYPS1*의 염기서열 및 예상되는 아미노산 서열을 나타낸 것이다(① : 신호서열, ② : 예상되는 GPI ancho, ③ : 소수성 아미노산- 끝지막 정착 도메인).

도 2는 한세놀라 폴리모르파 앱신1과 사카로마이세스 세레비시에 앱신계통의 단백질 분해효소들과 아미노산 서열을 비교한 것이다.

도 3은 한세놀라 폴리모르파 앱신1 유전자 *HpYPS1*가 발현됨에 따라 사카로마이세스 세레비시에 앱신 다중 결손 유전자의 온도 민감성이 회복됨을 보여주는 기능보완 (functional complementation) 실험 결과도이다.

도 4는 한세놀라 폴리모르파 앱신1 유전자 파쇄 변이주 *hpyps1Δ* 제작과정에 관한 도식이다.

도 5는 한세놀라 폴리모르파 야생형과 앱신1 유전자 파쇄 변이주인 *hpyps1Δ* 배양액의 단백질 분해 활성을 인체 부갑상선 호르몬을 기질로 사용하여 비교 분석한 결과도이다.

도 6은 한세놀라 폴리모르파용 인체 부갑상선 호르몬 발현 벡터 pMOXhPTH 제작 도식도이다.

도 7A는 발현벡터 pMOXhPTH로 형질전환된 한세놀라 폴리모르파 야생형과 변이주 *hpyps1Δ*의 염색체를 분리하여 발현벡터 삽입 위치 및 카피수를 측정하기 위한 서던 블롯(Southern blot) 결과이다.

도 7B는 한세놀라 폴리모르파 야생형과 변이주 *hpyps1Δ* 형질전환체에서의 재조합 인체 부갑상선 호르몬의 발현 및 분해 양상을 비교 분석하기 위해 효모 배양액을 SDS-폴리아크릴 아마이드 전기영동한 후 염색한 결과이다.

도 8A는 한세놀라 폴리모르파 야생형과 *HpYPS1* 유전자가 파쇄된 변이주 *hpyps1Δ*를 숙주로 사용하여 재조합 인체 혈장 알부민의 발현 및 분해 양상을 비교 분석한 결과도로서, 효모 배양액을 SDS-폴리아크릴 아마이드 전기영동한 후 염색한 결과이다.

도 8B는 한세놀라 폴리모르파 야생형과 *HpYPS1* 유전자가 파쇄된 변이주 *hpyps1Δ*를 숙주로 사용하여 재조합 인체 혈장 알부민의 발현 및 분해 양상을 비교 분석한 결과도로서, 효모 배양액을 웨스턴 블롯(Western blot)으로 분석한 결과이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<11> 본 발명은 메탄올자화 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*)로부터 재

조합 단백질의 분해를 효율적으로 방지함으로써 분비발현된 재조합 단백질을 고효율로 생산하는 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 본 발명은 한세놀라 폴리모르파 아스파텍 프로테아제 계열의 앱신1을 코딩하는 HpYPS1 유전자를 클로닝하고 이를 활용하여 앱신1 유전자가 파쇄된 한세놀라 폴리모르파 균주를 제작하고, 상기 균주를 숙주로 하는 형질전환체를 배양하여 인체 부갑상선 호르몬, 인체 혈장 알부민과 같은 재조합 단백질의 분해를 방지함으로써 완전한 형태의 재조합 단백질을 한세놀라 폴리모르파에서 고수율로 생산하는 방법에 관한 것이다.

<12> 최근 난치성 질환의 증가와 국민의료 수준의 향상에 따라 고순도 단백질성 의약품의 수요가 급증하면서 의약품 재조합 단백질이 건강 관련 생명공학 분야에서 차지하는 비중이 매우 높아지고 있다. 이에 따라 의약품 재조합 단백질 대량생산을 위한 숙주 시스템으로 단세포 진핵 미생물인 효모를 이용하는 빈도가 점차로 증가되고 있다. 특히 고등 동물세포와 매우 유사한 단백질 분비 경로를 지녔기에 효모는 인체 유래의 분비 단백질 생산을 위한 미생물 숙주시스템으로 애용되고 있다. 또한 대부분의 효모는 평상시 세포 밖으로 분비하는 단백질 수가 아주 적기 때문에 효모로부터 분비되는 재조합 단백질은 쉽게 회수되고 정제될 수 있는 장점도 있다. 근래에는 전통효모 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*)외에도 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*)와 피키아 패스토리스(*Pichia pastoris*)를 필두로 하는 비전통 효모들을 이용한 혈청 단백질, 백신 및 여러 다양한 중요한 의료용 단백질들의 대량생산이 성공적으로 진행되고 있다 (Gellissen G. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54, 741 (2000)).

<13> 진핵 미생물인 효모는 포유동물 세포와 거의 동일한 방법으로 단백질을 분비하며 유사한 단백질 수식 및 절단과정을 갖고 있다. 분비 경로를 거치게 되는 단백질들은 소포체

에서 그들의 최종적인 삼차구조를 갖추게 되고 당단백질인 경우 N- 및 O-결합형 당쇄가 부착된다. 추후 골지체로 운송된 단백질들은 올리고당의 첨가 또는 단백질 절단 같은 단백질 수식과정을 좀더 거친 후 여러 기관으로 운송되거나, 세포막의 성분으로 삽입되거나, 또는 세포 밖으로 배출된다. 이와 같이 효모에서의 단백질 분비과정은 여러 종류의 번역 후 수식(post-translational modification) 과정을 포함하고 있어 외래 단백질을 효모에서 분비 생산하고자 할 때 이에 따른 여러 문제점들이 발생할 수 있다. 특히 효모를 이용하여 재조합 단백질을 분비 생산할 때 생산성의 증가를 위해서는 효율적인 발현 및 분비 시스템의 사용은 필수적이지만 생산 분비된 외래단백질의 분해를 방지하는 것도 매우 중요하다. 재조합 효모를 고농도로 발효조에서 장시간 배양할 때 숙주세포로부터 자연적으로 분비되거나 또는 세포 분해(cell lysis)를 통해서 세포내에 존재하는 단백질 분해효소가 배지로 배출되어 생산된 재조합 단백질을 분해하여 전체적인 재조합 단백질의 생산성을 저하하는 문제가 생긴다. 이를 해결하기 위해 사카로마이세스 세레비시애, 한세놀라 폴리모르파, 피키아 패스토리스 등 재조합 단백질 발현시스템으로 개발되고 있는 효모들의 경우 여러 단백질 분해효소 결손 균주들이 개발되고 있는 데 일차적으로 효모 액포(vacuole)에 존재하는 분해효소들을 코딩하는 유전자들, PEP4, PRB1, 또는 CPY 유전자가 파쇄된 균주들이 개발되었다(Alvarez et al., J. Biotechnol. 38, 81 (1994); Chen et al., Curr. Genet. 27, 201 (1995); Gleeson et al., Methods Mol. Biol. 103, 81 (1998); Kang et al. In Hansenula polymorpha (ed. Gellissen G.) pp124 (2001)). 이들 액포 분해효소들 외에도 골지체(Golgi)에 존재하는 카르복시펩티다아제 α 를 코딩하는 KEX1 유전자가 파쇄된 *kex1 Δ* 균주가 개발되어 사카로마이세스 세레비시애의 경우에는 히루딘(Hinnen et al., In Gene expression in recombinant microorganisms (ed.

Smith A.), pp121 (1995)), 한세놀라 폴리모르파의 경우는 인체 표피 성장인자(human epidermal growth factor)(Heo et al., Protein expr. purif. 24, 117 (2001)), 피키아 패스트리스의 경우에는 설치류 또는 인체 엔오스타틴(endostatin)의 C-말단 분해가 상당히 감소되는 효과가 있었다(Boehm et al., Yeast 15, 563-567 (1999)).

<14> 최근 사카로마이세스 세레비시애에서 단일 또는 쌍으로 존재하는 염기성 아미노산 (basic amino acids)를 인지하여 절단하는 활성을 지닌 효모 아스파틱 프로테아제 계통의 앱신(yapsin)이 세포막에 존재하는 새로운 프로테아제로 발견되었다(Egel-Mitani et al., Yeast 6, 127-137 (1990)). 최근 공개된 사카로마이세스 세레비시애 게놈 정보에 의해 효모 아스파틱 프로테아제들 중에서 가장 먼저 알려진 앱신1(yapsin1)[이전에는 yeast aspartic protease 3(YAP3)로 알려짐]과 그 후 발견된 앱신2(기존명 MKC7)(Komano and Fuller, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 7,92,10752-10756 (1995))외에도 유사한 기능을 갖고 있다고 추측되는 단백질 분해효소로 앱신3, 앱신6 와 앱신7 등 최소한 다섯 가지 이상의 앱신 계통 분해효소들을 코딩하는 유전자들이 존재함이 보고되었다(Olsen et al. Biochem. J. 339:407-411 (1999)). 아직 이들 앱신의 생리적 기능에 대해서는 규명되지 않았지만, 앱신

의 프로테아제 활성화에 의해서 사카로마이세스 세레비시애에서 분비 생산하고자 하는 목적 재조합 단백질이 절단된다는 연구사례가 보고가 증가됨에 따라 앱신 결손 효모 균주가 재조합 단백질, 특히 염기성 아미노산을 지닌 외래 펩타이드 생산을 위해 매우 유용한 균주로 주목을 받고 있다. 현재까지 사카로마이세스 세레비시애에서 분비 생산하고자 했을 때 앱신에 의해 절단되는 문제가 보고된 재조합 단백질로는 인체 혈청 알부민 (Kerry-williams et al., Yeast 14, 161-169 (1998)), 인체 부갑상선 호르몬((Kang et al., Appl Microbiol Biotechnol. 50; 187-192 (1998)); 대한민국특허등록 제 0246932 호(12월 8일 1999년)), 곤충 이노 호르몬(Copley et al., Biochem J. 330. 1333-1340 (1998)), 글루카곤 및 글루카곤 유사 펩타이드 (Egel-Mitani et al., Enzyme Microb Technol. 26, 671-677 (2000): 미국특허 6,110,703), 인체 엘라핀 전구체 (Bourbonnais et al., Protein Exp. Purif. 20, 485 (2000)) 이 알려져 있다. 특히 본 발명자들은 YPS1 결손 사카로마이세스 세레비시애 균주의 경우 발효조를 이용한 배양 말기에서는 hPTH의 분해가 상당히 진행되므로 이를 방지하기 위해 앱신2와 앱신3에 대한 유전자 YPS2과 YPS3이 함께 제거된 앱신 다중 결손 사카로마이세스 세레비시애 변이주(yps1 Δ /yps2 Δ /yps3 Δ)를 개발하여 고농도 배양에서 관찰되는 인체 부갑상선 호르몬의 분해를 90% 이상 방지하는 성과를 얻었다(대한민국 특허출원 2000-51267 및 국제출원 PCT/KR01/01447).

- <15> 메탄올자화 효모인 한세놀라 폴리모르파는 피키아 패스토리스와 더불어 강력하면서도 조절 가능한 프로모터들이 개발되어 있으며 외래 유전자를 숙주 염색체내로 다중 도입하는 장점이 있어 재조합 단백질 대량생산에 매우 유용한 효모 숙주로

각광을 받고 있다(Faber et al., Yeast 11, 1331(1995)). 현재까지 매우 다양한 종류의 많은 외래 단백질들이 발현되었는데, 그 발현 수준은 대부분 발효조를 이용한 고농도 배양시 1 g/L 이상이었고 재조합 파이타제(phytase)의 분비·생산의 경우 13.5 g/L 정도의 보고되어 이 한세놀라 폴리모르파 발현시스템은 현재 이용 가능한 여러 진핵세포 발현 시스템들 중에서 가장 강력한 시스템의 하나로 부각되고 있다(Mayer et al., Biotechnol. Bioeng. 63, 373-381 (1999)). 특히, 한세놀라 폴리모르파에서 초기에 생산된 재조합 단백질들의 일부는 이미 임상실험을 통과하여 시장에 진출(예, B형 간염 백신)되거나 현재 제품 개발 단계(예, 히루딘)에 있어 의약품으로 개발될 재조합 단백질 대량 생산을 위한 발현시스템으로 한세놀라 폴리모르파가 매우 적합하다고 평가되고 있다(Gellissen G., Appl Microbiol Biotechnol. 54 741-750 (2000)). 또한 최근 포스트 게놈 시대에 들어서 신규 유전자들의 기능 분석을 위한 고효율 발현시스템에 대한 수요의 증가로 인해, 한세놀라 폴리모르파를 이용한 발현 시스템은 고등 진핵세포 유래의 유용 단백질의 대량생산뿐만 아니라 신규 단백질들의 기능 및 구조분석에도 큰 일익을 담당할 것으로 기대된다.

- <16> 이에 본 발명의 목적은 고효율 한세놀라 폴리모르파 발현시스템 개발을 위한 노력의 일환으로 앵신 계통의 프로테아제에 의해 원하지 않는 재조합 단백질의 절단 및 분해 문제를 해결하기 위해 한세놀라 폴리모르파 앵신1을 코딩하는 유전자 HpYPS1을 클로닝하고 이를 활용하여 HpYPS1 유전자 결손 변이주를 제작하고 이를 재조합 단백질 발현 숙주로 이용하여, 한세놀라 폴리모르파에서 발현되는 재조합 단백질의 절단 및 분해를 방지하여 원형상태의 재조합 단백질을 고효율로 분비 생산하는 기술을 제공하는 것이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<17> 본 발명은 상기에서 기술한 목적인 원형상태의 재조합 단백질을 고효율로 분비 생산하는 한세놀라 폴리모르파 균주 개발을 위해 한세놀라 폴리모르파 앵신 프로테아제 유전자를 클로닝하고 이를 파쇄함으로써 한세놀라 폴리모르파에서 일어나는 재조합 단백질의 분해를 극소화함으로써 한세놀라 폴리모르파에서 재조합 단백질을 고효율로 분비 생산하는 발현시스템을 제공하는 것이다.

<18> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들은 한세놀라 폴리모르파 앵신1을 코딩하는 유전자 HpYPS1을 클로닝하고 상기 확보된 HpYPS1 유전자의 기능 분석을 수행한 후 HpYPS1 유전자가 파쇄된 한세놀라 폴리모르파 변이주(hpyps1Δ)를 개발하고 이를 인체 부갑상선 호르몬 또는 인체 혈청 알부민 발현 숙주 균주로 사용하여 한세놀라 폴리모르파에서 발현 분비되는 재조합 단백질의 분해를 현저하게 방지하여 생산성을 증가시키는 방법을 제공한다.

【발명의 구성 및 작용】

<19> 본 발명은 한세놀라 폴리모르파에서 앵신계통의 단백질 분해효소에 대한 유전자 HpYPS1이 결손된 효모균주를 숙주로 하여 재조합 단백질을 분비 생산하는 방법을 포함한다. 본 발명은 한세놀라 폴리모르파 단백질 분해효소 앵신1을 코딩하는 유전자 HpYPS1을 클로닝하는 과정; 사카로마이세스 세레비시아의 앵신 다중 결손 변이주의 온도 민감성 보완 실험을 통한 상기 확보된 한세놀라 폴리모르파 HpYPS1 유전자의 기능 분석 과정; 한세놀라 폴리모르파에서 HpYPS1 유전자가 파쇄된 변이주 hpyps1Δ를 제작하고 앵신 활성을 분석하는 과정; 상기 한세놀라 폴리모르파 변이주 hpyps1Δ를 숙주로 활용하여 인체 부갑상선 호르몬을 발현 분비하는 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주 hpyps1Δ

-pMOXhPTH와 인체 혈청 알부민을 발현 분비하는 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주 hpyps1Δ-pYHSA12를 제작하여 재조합 단백질들의 분해 정도를 분석하는 과정으로 구성되어 있다. 따라서, 본 발명은 메탄올자화 효모 한세놀라 폴리모르파()로부터 발현된 재조합 단백질의 분해를 방지함으로써 재조합 단백질을 효율적으로 생산하는 방법에 관한 것으로, 한세놀라 폴리모르파 아스파틱 프로테아제 계열의 앱을 코딩하는 *HpYPS1* 유전자를 클로닝하고 이를 활용하여 *HpYPS1* 유전자가 결손된 한세놀라 폴리모르파 균주를 제작하고, 상기 균주를 숙주로 하는 형질전환체를 배양하여 재조합 단백질의 분해를 극소화함으로써 완전한 형태의 재조합 단백질을 고수율로 생산하는 방법에 관한 것이다.

<20> 본 발명에서 클로닝한 한세놀라 폴리모르파 YPS1 유전자 (*HpYPS1*)의 염기서열(서열번호 1)을 Accession Number AF493990로 GenBank에 기탁하였다. 또한, 한세놀라 폴리모르파 단백질 분해효소 앱을 코딩하는 유전자 *HpYPS1*는 국제기탁기관 Korean Collection for Type Cultures에 2002년 6월 21일에 기탁하고 수탁번호 KCTC 10285BP를 부여받았다. 한세놀라 폴리모르파에서 *HpYPS1* 유전자가 파쇄된 변이주 hpyps1Δ도 국제기탁기관 Korean Collection for Type Cultures에 2002년 6월 21일에 기탁하고 수탁번호 KCTC 10281BP를 부여받았다. 한 양태로서, 인체 부갑상선 호르몬을 발현 분비하는 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주 hpyps1Δ-pMOXhPTH 또한 국제기탁기관 Korean Collection for Type Cultures에 2002년 6월 21일에 기탁하고 수탁번호 KCTC 10282BP를 부여받았다. 추가의 양태로서, 인체 혈청 알부민을 발현 분비하는 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주 hpyps1Δ-pYHSA12 또한 국제기탁기관 Korean Collection for Type Cultures에 2002년 6월 21일에 기탁하고 수탁번호 KCTC 10283BP를 부여받았다.

- <21> 한 가지 관점으로서, 본 발명은 도 1에 도시된 염기 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다.
- <22> 다른 관점으로서, 본 발명은 도 1에 도시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다.
- <23> 또 다른 관점으로서, 본 발명은 한세놀라 폴리모르파 앱신1을 코딩하는 HpYPS 유전자의 돌연변이로 인해 앱신 활성이 감소된 한세놀라 폴리모르파 변이주를 제공한다.
- <24> 또 다른 관점으로서, 본 발명은 한세놀라 폴리모르파 변이주에 외래단백질을 코딩하는 유전자를 도입하여 제작된 외래 단백질을 발현하는 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주를 제공한다.
- <25> 또 다른 관점으로서, 본 발명은 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주를 외래 단백질이 발현되도록 하는 조건하에서 배양하고 배양물로부터 외래 단백질을 분리함을 포함하여, 외래 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.
- <26> 이하 본 발명의 내용을 실시예를 통해 구체적으로 설명하기로 한다. 다만 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하는 것으로 되지는 아니한다.
- <27> <실시예 1>
- <28> 폴리모르파 앱신 1 유전자 HpYPS1 클로닝 및 염기서열 분석

- <29> 한세놀라 폴리모르파에서 앱신1을 코딩하는 유전자를 찾아내기 위해 한세놀라 폴리모르파에 대해 보고된 무작위 염기 서열 (random sequenced tag, RST) (Blandin et al., FEBS Lett. 487, 76, (2000)) 정보를 토대로 한 쌍의 합성 올리고뉴클레오타이드 (5'-GAAGTGCAGCAGCAGCTCCTGAACC-3'; 서열번호 3,
- <30> 5'-GGCTGATGACGGCTCGGTCACGATGG-3'; 서열번호 4)를 제작하고 이들을 프라이머로 이용한 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 통해 한세놀라 폴리모르파 DL-1L 유래의 염색체로부터 0.88 kb DNA 절편을 증폭하고 이를 탐침으로 사용하여 서던 블롯 (Southern blot)을 실시하였다. 서던 블롯 결과를 바탕으로 한세놀라 폴리모르파 염색체 DNA에서 3.5 kb의 HindIII 절편을 추출해내어 게놈 라이브러리를 제조하고 이를 대장균에 형질전환시켰다. 콜로니(colony) PCR을 통해서 HpYPS1 DNA 탐침과 반응하는 DNA 절편을 분리하고 염기서열 분석을 수행하여 사카로마이세스 세레비시애 YPS1 유전자와 높은 유사성을 보이는 1728 bp 크기의 단백질 코딩 지역(open reading frame:ORF)이 포함된 DNA 절편을 확보하였다(도 1). 한세놀라 폴리모르파 YPS1 유전자(HpYPS1) 산물의 경우 사카로마이세스 세레비시애 앱신1에서 보고되었듯이 N-말단의 1-17 아미노산이 신호서열이며, C-말단의 556-575 아미노산들로 구성된 지역은 끝지막에 정착할 수 있는 도메인(domain)으로 추정되며 사카로마이세스 세레비시애 앱신들처럼 글라이코실포스파티딜이노시톨(glycosylphosphatidylinositol) 앵커(anchor)가 부착될 수 있는 구조적인 특징을 갖고 있다(도 1). 한세놀라 폴리모르파 앱신1(서열번호 2)은 사카로마이세스 세레비시애 앱신1과 36% 동일성과 52%의 높은 유사성을 보이며 그 외의 앱신 프로테아제와도 30% 이상의 동일성을 보인다(도 2, 표 1).

<31> 【표 1】

HpYPS1과 ScYPS 유전자들과의 동일성 및 유사성 비교*

	<i>ScYPS1</i>	<i>ScYPS2</i>	<i>ScYPS3</i>	<i>ScYPS6</i>	<i>ScYPS7</i>
<i>HpYPS1</i>	36%(52%)	31%(49%)	30%(44%)	26%(44%)	29%(34%)

<32> * 유사성은 ()안에 표시

<33> <실시에 2>

<34> 한세놀라 폴리모르파 HpYPS1 유전자의 기능 분석

<35> 전통 효모 사카로마이세스 세레비시아의 경우, 사카로마이세스 세레비시아 W303 균주 배경으로 제작된 YPS1과 YPS2 이중 결손 변이주의 경우 37℃에서는 자라지 못하는 높은 온도 민감성을 보인다고 보고되었고(Komano and Fuller, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 7,92,10752-10756 (1995)), 본 발명자들이 사카로마이세스 세레비시아 L3262 배경으로 제작한 앵신 다중 결손 변이주들은 YPS1/YPS2/YPS3 3개의 유전자가 파쇄된 균주인 SLH18 (*yps1Δ/yps2Δ/yps3Δ*)를 비롯하여 YPS1/YPS2/YPS3/YPS6 4개 유전자 파쇄균주(SLH23)와 YPS1/YPS2/YPS3/YPS6/YPS7 5개의 유전자가 파쇄된 균주(SLH28)에서 공통적으로 고온에 대한 온도 민감성을 보이는 특징이 관찰되었다. 한세놀라 폴리모르파 앵신1 유전자 HpYPS1의 기능을 분석하기 위한 방법의 일환으로 HpYPS1 유전자를 상기 사카로마이세스 세레비시아 다중 앵신 변이주에 형질전환시켜 한세놀라 폴리모르파 앵신1 유전자 발현이 사카로마이세스 세레비시아 다중 앵신 변이주들의 온도 민감성을 회복시킬 수 있는지를 살펴보는 기능보완(functional complementation) 실험을 수행하였다. HpYPS1 유전자를 사카로마이세스 세레비시아에서 발현시키기 위해 HpYPS1 유전자가 포함된 3.2 kb DNA 절

편을 사카로마이세스 세레비시아용 벡터 YEp352(Hill et al., Yeast 2, 163, (1986))에 삽입하여 YEp-HpYPS1을 제작하였다. 도 3에서 보듯이 HpYPS1 유전자가 포함된 벡터인 YEp352-HpYPS1로 형질전환된 사카로마이세스 세레비시아 앵신 다중 결손 변이주들은 30℃와 37℃에서 배양했을 때 37℃에서도 야생형과 같은 생장을 보였지만, 대조구로 사용된 YEp352 벡터만으로 형질전환된 앵신 다중 결손 변이주는 37℃에서 성장하지 못했다. 이는 사카로마이세스 세레비시아 앵신 유전자의 다중 결손으로 인한 온도 민감성을 한세놀라 폴리모르파의 앵신 1 유전자 발현에 의해 극복됨을 입증함으로써 본 발명에서 클로닝한 한세놀라 폴리모르파 유전자 HpYPS1이 사카로마이세스 세레비시아의 앵신 유전자와 기능적인 상동체임을 뒷받침해주는 근거가 된다.

<36> <실시예 3>

<37> HpYPS1 유전자 파쇄 균주 제작 및 앵신 활성 분석

<38> 상기 확보된 HpYPS1 유전자를 활용하여 한세놀라 폴리모르파 앵신 결손 변이주 hpyps1 Δ 를 개발하여 앵신에 의한 단백질 분해 활성 변화여부를 분석하였다. 한세놀라 폴리모르파 앵신 1을 코딩하는 HpYPS1 유전자가 파쇄된 변이주를 제작하기 위해 한세놀라 폴리모르파 염색체 DNA로부터 표 2에 기술된 프라이머를 이용한 융합 증합효소 연쇄반응 (fusion PCR)(Oldenhurg et al., Nucleic Acid Res. 25, 451, (1997))을 수행하고, 이로부터 얻은 DNA 절편을 한세놀라 폴리모르파 DL1-LdU (leu2 Δ ura3::lacZ; Kang et al., In Hansenula polymorpha: Biology and Application (Ed. G. Gellissen), pp 124 (2002))

균주에 형질전환시켜 세포내 상동 재조합(in vivo homologous recombination)을 유도함으로써 유전자의 파쇄를 시도하였다. 더 상세히 설명하면, 우선 1차 중합효소 연쇄반응에 의하여 HpYPS1 유전자의 N-말단과 C-말단 그리고 URA3 유전자를 확보하고, 2차 결합 중합효소 연쇄반응에 의해서 HpYPS1 유전자의 N-말단과 C-말단을 각각 URA3 유전자의 N-말단과 C-말단에 결합시켰다. 이와 같은 방법으로 확보한 각각의 DNA 두 절편을 효모의 세포 내로 도입시킨 후 일차적으로 URA3 선별 표지로 유라실(uracil)이 결핍된 최소배지에서 자라는 형질전환체들을 골라내고, 이차적으로 중합효소 연쇄반응을 통해 야생형 균주와 다르게 증폭된 DNA 절편을 확인하여 HpYPS1 유전자가 파쇄된 한세놀라 폴리모르파 변이주인 *H. polymorpha* DL1-hpyps1 Δ (*leu2* Δ *ura3::lacZ yps1::URA3*) 균주를 제작하였다(도 4).

<39> 상기 제작된 한세놀라 폴리모르파 hpyps1 Δ 변이주와 야생형 균주의 앱신 활성을 비교하기 위해 인체 부갑상선 호르몬(human parathyroid hormone; hPTH)을 기질로 사용하여 YPD (1% 효모추출물, 2% 펩톤, 2% 글루코즈) 배지에서 10시간 배양하여 확보한 효모 배양액의 단백질 분해 활성을 분석하였다. 기질로 작용하는 hPTH(약 1.6 μ g)을 1/4배로 희석한 효모 배양액 20 μ l와 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 각각 2시간, 4시간, 6시간 반응시켜 SDS-폴리아크릴아마이드 겔에 걸어 앱신 활성에 의한 인체 부갑상선 호르몬의 분해정도를 비교 분석하였다. 도 5에서 보듯이 야생형의 배양액은 이미 2시간 이후부터 배양액에 남아 있는 hPTH를 관찰하기 어려운 반면 hpyps1 Δ 변이주의 배양액은 반응시간이 늘어남에 따라 hPTH의 양이 다소 감소되기는 하나 상당량이 남아있었다. 이는 한세놀라 폴리모르파 YPS1 결손변이주인 hpyps1 Δ 의 배양액은 야생형 균주의 배양액에 비해 현저하게 감소된 hPTH 분해 활성을 갖고 있음을 시사한다. 상기 결과는 사카로마이세스 세레비시

에 YPS1 결손 변이주를 대상으로 수행된 선행연구(Kang et al., Appl Microbiol Biotechnol. 50, 187, (1998))와 동일한 결과를 보여주고 있어 HpYPS1가 한세놀라 폴리모르파의 앱신 프로테아제를 코딩하는 유전자이며 본 발명에서 개발된 HpYPS1 결손 변이주는 앱신 활성이 감소되었음을 뒷받침해주고 있다.

<40> 【표 2】

HpYPS1 유전자 파쇄를 위한 결합 중합효소 연쇄반응에 사용된 프라이머

프라이머	서열	서열번호
YPS(NF)	5'-GGACACGCAAGAGGTGTCTG- 3'	5
YPS(NR+rp)	5'-AGCTCGCTACCGGGGATCCGCAACTTTCATGTGTCAAC- 3'	6
YPS(CF+rp)	5'-GCACATCCCCCTTTCGCCAGCCTCTTCGGTGC GGTTGACC- 3'	7
YPS(CR)	5'-GCTCGGCTCCAGGATTCAGG- 3'	8
URA3 N-S	5'-GGATCCCGGGTACCGAGCT- 3'	9
URA3 N-A	5'-CACCGGTAGCTAATGATCCC- 3'	10
URA3 C-S	5'-CGAACATCCAAGTGGGCCGA- 3'	11
URA3 C-A	5'-CTGGCGAAAGGGGATGTGC- 3'	12

<41> <실시예 4>

<42> hPTH 발현 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주 제작 및 hPTH 발현 분석

<43> 실제로 인체 부갑상선 호르몬 (hPTH)을 한세놀라 폴리모르파에서 분비 발현시키기 위해 한세놀라 폴리모르파용 인체 부갑상선 호르몬 발현 벡터인 pMOXhPTH를 도 6에 제시된 방법으로 제작하였다. 즉, 사카로마이세스 세레비시에 발현 벡터인 pG10-hPTH(Chung et al., Biotechnol Bioeng. 57, 245, (1998))에서 신호서열(signal sequence)과 hPTH를 포함하는 0.53 kb 크기의 EcoRI /Sal I 절편을 확보하여 한세놀라 폴리모르파용 인체 혈장 알부민 발현 벡터인 pYHSA12(Kang et al., Biotechnol Bioeng.

76, 175, (2001))에서 알부민 유전자가 제거된 7.8 kb 크기의 Xba I /EcoR I 절편을 확보하여 두 DNA 절편을 연결함으로써 pMOXhPTH를 제작하였다. 상기 제작된 벡터 pMOXhPTH를 한세놀라 폴리모르파 hpyps1 Δ 변이주와 야생형 균주에 도입하여 루이신(leucine)이 결핍된 최소배지에서 자라는 형질전환체들을 선별하고, 이와 같은 방법으로 확보한 Leu⁺ 형질전환체들을 안정화시키기 위해 접종 후 매 24 시간마다 루이신이 결핍된 액체 최소 선택 배지로 옮겨주기를 5회 반복하였다(Sohn et al., Appl Microbiol Biotechnol. 51, 800, (1999)). 이와 같은 방법으로 확보한 Leu⁺ 형질전환체들의 배양액을 다양한 농도의 G418이 포함된 최소배지에 도말하고, 37℃에서 배양하여 얻은 여러 콜로니(colony)로부터 염색체 DNA를 분리하여 1.5 kb 한세놀라 폴리모르파 LEU2 유전자를 탐침으로 Sambrook 등(Molecular cloning Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)의 방법에 의해 서던 블롯(Southern blot)을 수행함으로써 발현 벡터의 염색체로의 삽입을 확인하였다 (도 7A). 탐침으로 사용한 한세놀라 폴리모르파 LEU2 유전자는 비방사성 DNA 표지 및 감지 키트 (Non-radioactive DNA labelling and detection kit)를 사용하여 디그옥시제닌(digoxigenin)으로 표지하여 제조하였다. 예측한대로, G418 농도가 높은 배지에서 선별된 형질전환체들에서 벡터 pMOXhPTH의 다중 도입이 관찰되었으며 최대 5-6 카피 수 정도 삽입되었다고 추정된다.

<44> 상기 hPTH 발현 벡터가 염색체로 삽입되었음이 확인된 hPTH 발현 재조합 효모 균주들중 일부 균주들(a, b, c, d, e, f)을 YPM(1% yeast extract, 2% peptone, 2% methanol)배지에 접종하여 37℃에서 12시간, 24시간 후 얻은 효모 배양액을 TCA(trichloroacetic acid)로 처리해 세포 밖으로 분비된 단백질을 20배로 농축하고 15% SDS-폴리아크릴아마이드 겔에 걸어 전기영동을 수행한 후 쿠마시 Coomassie Brilliant

Blue R-250으로 염색하였다(도 7B). 한세놀라 폴리모르파 야생형과 hpyps1 Δ 변이주에서 분비 발현된 인체 부갑상선 호르몬을 비교해 보았을 때 야생형으로부터 수득한 배양액에서는 대부분의 hPTH가 분해되어 미량의 분해산물(d1)만이 관찰되고 온전한 크기의 hPTH(i)는 관찰하기 어려운 것과 대조적으로 hpyps1 Δ 변이주로부터 수득한 단백질에서는 단지 12시간 배양 후에 명확하게 온전한 크기의 hPTH의 분비발현이 관찰되었다. 비록 hpyps1 Δ 변이주에서도 배양시간이 길어짐에 따라 C-말단이 분해된 형태의 hPTH라고 여겨지는 밴드(d2)가 관찰되면서 온전한 크기의 hPTH는 감소되지만, 이 같은 결과는 앱신1 유전자가 파쇄된 hpyps1 Δ 변이주는 앱신 활성의 감소로 인해 재조합 인체 부갑상선 호르몬 분해가 크게 방지되므로 야생형에 비해 재조합 hPTH 분비발현을 위한 숙주로 매우 유용한 균주임을 보여주고 있다.

<45> <실시에 5>

<46> 한세놀라 폴리모르파 HpYPS1 유전자 결손 변이주에서의 재조합 인체 혈장 알부민(HSA)의 발현 분비 분석

<47> 사카로마이세스 세레비지애에서 분비 발현되는 인체 혈장 알부민(HSA)는 완전한 형태인 67 kDa로 발견되지만 일부 45 kDa의 분해된 형태의 재조합 단백질 역시 관찰되고 있다. 사카로마이세스 세레비지애 앱신1 유전자가 파쇄된 균주를 숙주로 사용하는 경우, 효모 세포 배양액으로 분비된 인체 혈장 알부민의 분해, 특히 45 kDa 크기의 분해산물의 생성이 감소된다고 보고되었다(Kerry Williams et al., Yeast 14, 161, (1998)). 본 발

명에서 개발된 한세놀라 폴리모르파 HpYPS1 유전자 결손 변이주에서의 재조합 인체 혈장 알부민의 발현 및 분해양상을 분석하기 위하여 LEU2 선별표지와 G418에 따른 벡터 삽입 수를 조절할 수 있는 특징을 가진 벡터에 MOX 프로모터와 인체 혈장 알부민을 결합시킨 발현벡터 pYHSA12(Kang et al., Biotech Bioeng. 76, 175, (2001))로 hpyps1 Δ 변이주를 형질전환시켰다. 재조합 한세놀라 폴리모르파 야생형 균주와 hpyps1 Δ 변이주를 YPGM (1% 효모추출물, 2% 펩톤, 1% 글리세롤, 2% 메탄올) 배지에서 배양하여 확보된 배양액을 SDS-폴리아크릴아마이드 겔을 걸어 질산은(silver nitrate)를 이용해 염색하거나 나이트로셀룰로즈 막(nitrocellulose membrane)에 이동시킨 후 HAS 항체에 의한 웨스턴 블롯(Western blot)을 통하여 HSA의 발현 및 분해양상을 살펴보았다. 도 8에서 보듯이 특히 24시간 배양후 야생형 균주보다 hpyps1 Δ 변이주에서 보다 많은 양의 HSA가 발현·분비되는 것을 관찰 할 수 있으며, 비록 전반적인 알부민 분해가 크게 방지되지는 않았지만 특히 사카로마이세스 세레비시에에서 관찰되었듯이 45 kDa 크기의 분해산물 생성이 야생형에 비하여 hpyps1 Δ 변이주에서 다소 감소함을 볼 수 있다. 고농도 발효조로 배양하는 경우 45 kDa 크기의 알부민 분해산물 생성이 더욱 심각한 문제로 제기됨을 고려할 때, hpyps1 Δ 변이주를 숙주로 하는 알부민 생산 시스템이 야생형 균주를 숙주로 이용한 생산 시스템에 비해서 주목할 만한 알부민 분해 감소로 인한 생산량의 증대가 기대된다.

【발명의 효과】

<48> 이상 설명한 바와 같이 본 발명은 단백질 분해효소 앱신 1 유전자가 결손된 한세놀라 폴리모르파 균주(hpyps1 Δ)를 재조합 단백질 생산 숙주로 이용하면 앱신

1020020037718

출력 일자: 2003/7/16

활성에 의한 재조합 단백질의 절단을 현저하게 감소시킴으로써 완전한 형태의 재조합 단백질
을 높은 수율로 분리·생산할 수 있어 한세놀라 폴리모르파를 이용한 재조합 단백질
생산을 도모하는 생명공학산업에 있어서 매우 유용하다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

도 1에 도시된 염기 서열을 포함하는 핵산 분자.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 한세놀라 폴리모르파 엡신1을 코딩하는 *HpYPS1* 유전자인 핵산 분자(기탁번호 KCTC 10285BP).

【청구항 3】

도 1에 도시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 외래 단백질 분비 시그널로 사용되는 *HpYSA* 폴리펩타이드의 분비 시그널 펩타이드.

【청구항 5】

한세놀라 폴리모르파 엡신1을 코딩하는 *HpYPS* 유전자의 돌연변이로 인해 엡신 활성이 감소된 한세놀라 폴리모르파 변이주.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 한세놀라 폴리모르파 엡신1을 코딩하는 *HpYPS1* 유전자가 파쇄된 한세놀라 폴리모르파 변이주(기탁번호 KCTC 10281BP).

【청구항 7】

제5항의 한세놀라 폴리모르파 변이주에 외래단백질을 코딩하는 유전자를 도입하여 제작된 외래 단백질을 발현하는 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주.

【청구항 8】

제7항에 있어서, 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주가 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주 hpyps1Δ-pMOXhPTH (KCTC 10282BP)인 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주.

【청구항 9】

제7항에 있어서, 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주가 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주 hpyps1Δ-pYHSA12 (KCTC 10283BP)인 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주.

【청구항 10】

제7항 내지 9항 중 어느 한 항에 따른 재조합 한세놀라 폴리모르파 균주를 외래 단백질이 발현되도록 하는 조건하에서 배양하고 배양물로부터 외래 단백질을 분리함을 포함하여, 외래 단백질을 제조하는 방법.

【五 1】

33-26

출력 일자: 2003/7/16

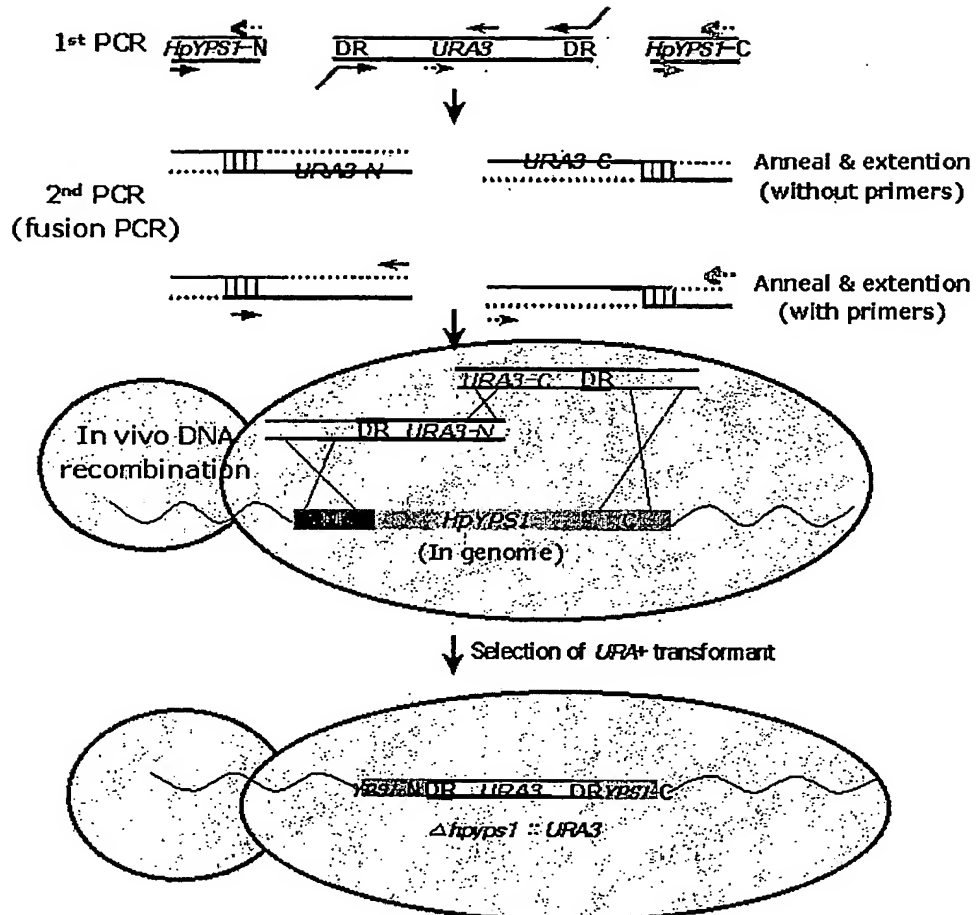
[illegible][illegible]

0pY7Y51 1 T C O R T E H T P Q C D R H A A T V E T V E S E V A L L F G A Y O S E T T H A A S F L D P A A S T Y T E R L N A G 1 329
 5eY751 1 T C O R T E V T H E A C E I B V S S Y T D S A W D G L F G A Y O S E T T H A A S F L D P A A S T Y T E R L N A G 1 366
 5eY752 1 T C R R T V F V K E S T O K S F A T L S L D D I D E H W G L F G A Y O S E T T H A A S F L D P A A S T Y T E R L N A G 1 331
 5eY753 1 T C R R T V F V K E S T O K S F A T L S L D D I D E H W G L F G A Y O S E T T H A A S F L D P A A S T Y T E R L N A G 1 362

[illegible][illegible]

33-27

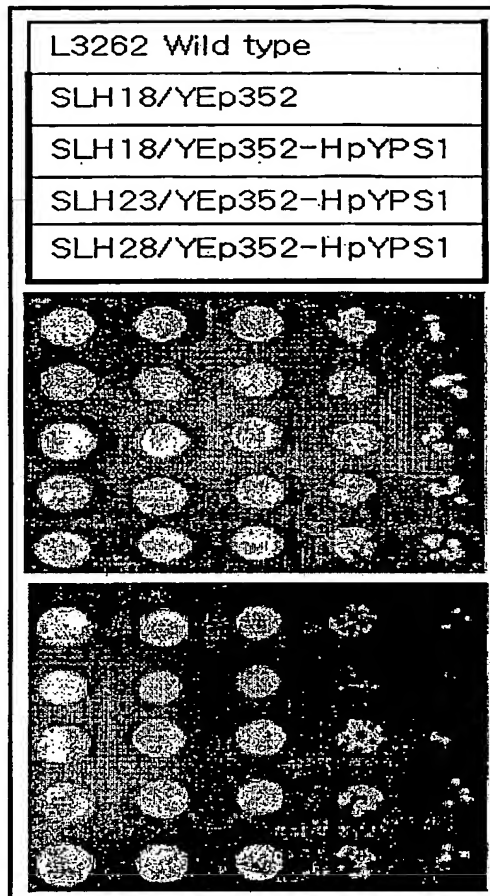
【도 3】



1020020037718

출력 일자: 2003/7/16

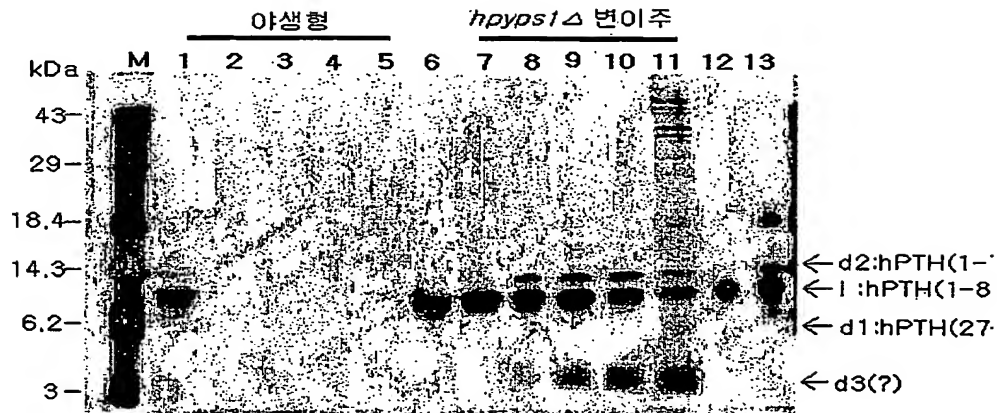
【도 4】



30℃ , 48hr

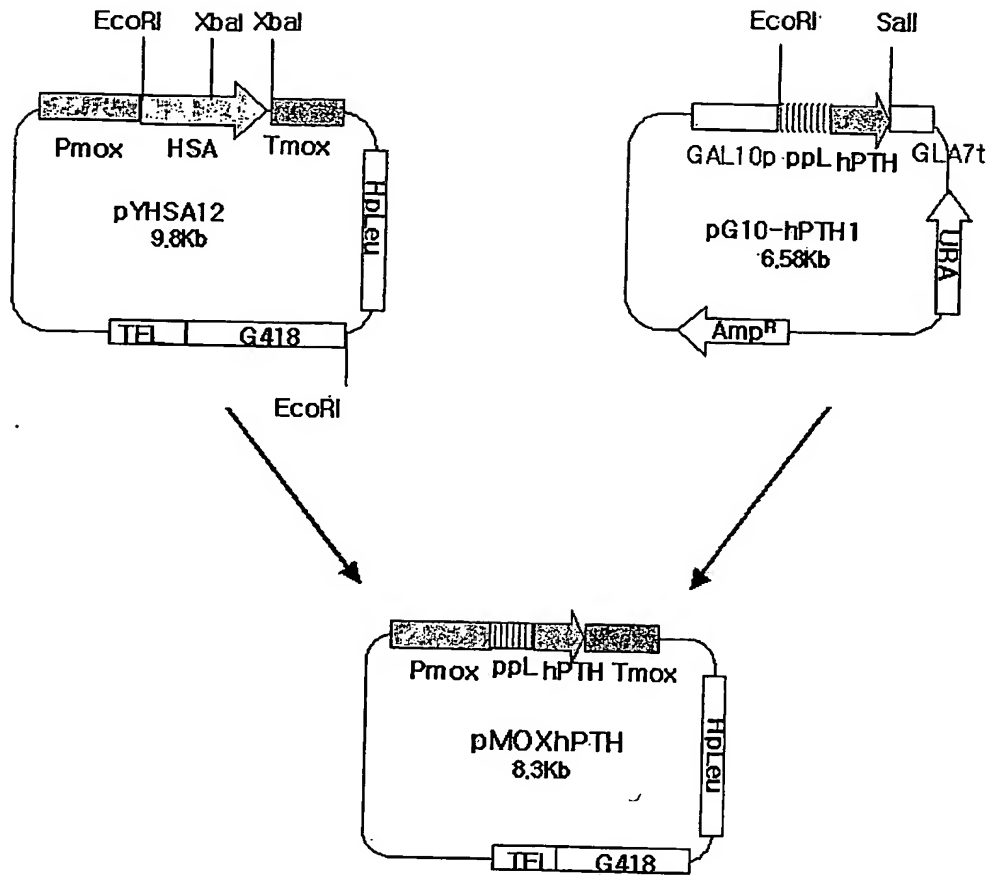
37℃, 48hr

【도 5】

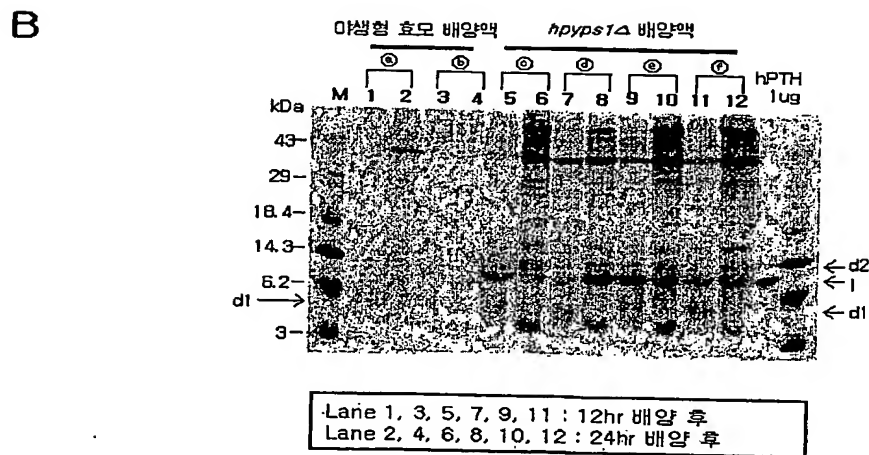
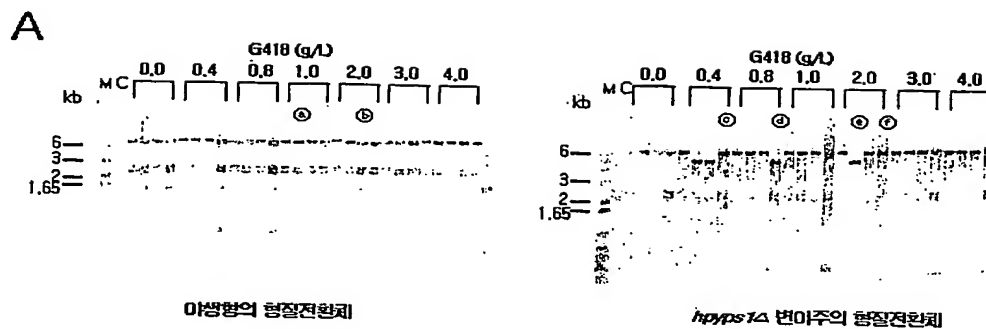


Lane M: Molecular marker
 1: 야생형, 0-h 반응
 2: 야생형, 2-h 반응
 3: 야생형, 4-h 반응
 4: 야생형, 6-h 반응
 5: 야생형, 24-h 반응
 6: 증류수+hPTH, 0-h 반응
 7: 변이주, 0-h 반응
 8: 변이주, 2-h 반응
 9: 변이주, 4-h 반응
 10: 변이주, 6-h 반응
 11: 변이주, 24-h 반응
 12: hPTH 100 ng
 13: hPTH 200 ng

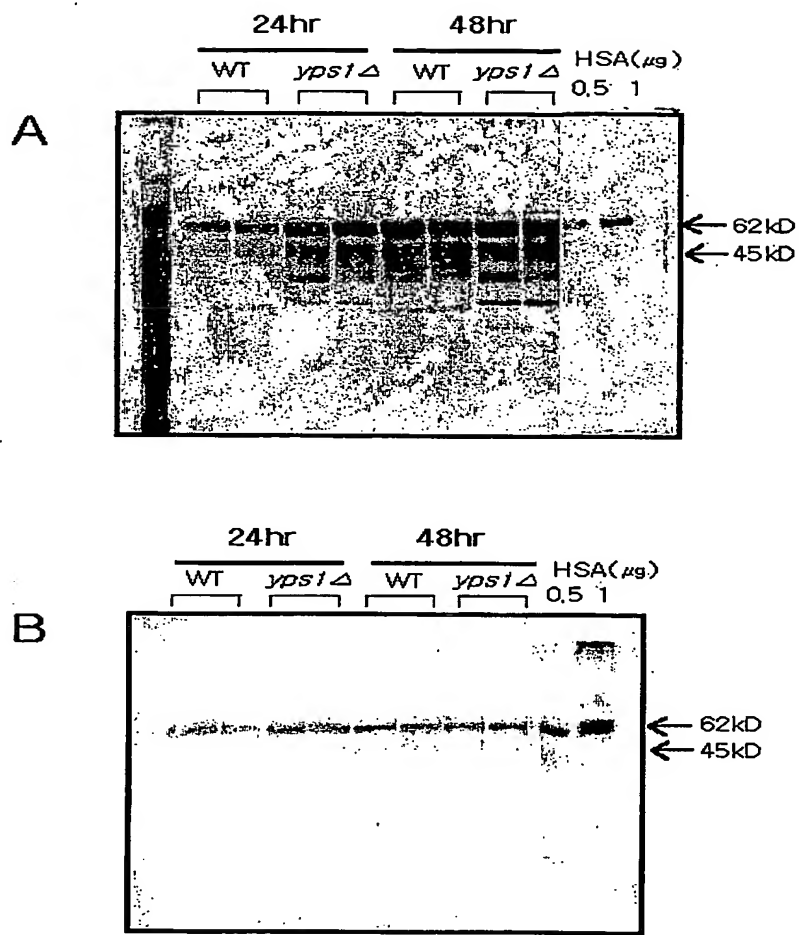
【도 6】



【도 7】



【도 8】



【서열목록】

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology <120> Hansenula ;

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.